

ABSTRACT

Functional insulin signalling results in tyrosine phosphorylations of the insulin receptor, which activates a plethora of signalling molecules. The extracellular signal is translated through post-translational modifications such as phosphorylation and ubiquitylation. To elucidate proteomic changes under diabetic conditions, the proteome, phosphoproteome and acetylome of liver samples from control and db/db mice under random fed conditions were investigated using a SILAC based LC-MS/MS approach. Among other promising candidates, a phosphorylation of FBXO30 on S383 was markedly reduced in db/db mice. FBXO30 is an E3 Ligase of the F-box only protein family and represents the substrate recognition unit of the SCF - complex. The regulation of FBXO30 S383 phosphorylation was further investigated and the performed experiments provide evidence that FBXO30 is phosphorylated on serine 383 by ERK1/2 in an insulin-IRS1 dependent manner. Next, the temporal transcriptional and post-transcriptional regulation of Fbxo30 in mice that were fasted overnight and exposed to food for 30, 60, 120 and 240 min was analysed using next generation sequencing and phosphoproteomics. This unbiased screen revealed that *Fbxo30* transcription was strongly enhanced after 30 and 60 min of refeeding and that many ERK1/2 dependent transcripts were highly correlated to the kinetics of *Fbxo30*. The phosphoproteome in liver of mice after 30 min of refeeding was assessed using LC-MS/MS and revealed that phosphorylation of S383 on FBXO30 is markedly augmented in physiological conditions of food intake. Interestingly, determining the protein abundance of FBXO30 after short-term refeeding (5,10,30 min) revealed decreased abundance after 30 min. This downregulation of FBXO30 correlated with the phosphorylation of ERK1/2 indicating that phosphorylation of FBXO30 leads to an activation and self-mediated degradation. To identify potential substrates of FBXO30, *Fbxo30*^{-/-} BAT cells were generated using CRISPR/Cas9 and transiently transfected with *Fbxo30* variants (FBXO30^{WT}, FBXO30^{ΔF-box} and *Fbxo30*^{8CA}). The affinity enrichment of lysine - GlyGly-remnant containing peptides and quantification by LC-MS/MS revealed more than 45,000 GlyGly sites. Additionally, an immunoprecipitation was utilized to identify potential substrates. Stringent filtering and comparison between all data sets, identified several cytoskeleton- and plasma membrane associated proteins involved in vesicle transport, especially GLUT4 translocation such as VCL, ACTN4, PIK3C2A and SORBS1.

Moreover, the *Fbxo*^{-/-} mouse was generated and challenged by high-fat diet (HFD) administration for 8 weeks. Preliminary results of a glucose tolerance and insulin tolerance test indicate that mice lacking *Fbxo30* expression exhibit a reduced glucose tolerance and insulin sensitivity.

To integrate and visualize the mass spectrometric data, a software suite called Instant Clue (<http://www.instantclue.uni-koeln.de>) has been developed. The software allows an intuitive analysis and visualization of various scientific data and the statistical repertoire includes approaches such as principal component analysis (PCA), SGCCA for multi-omics experimental designs as well as classification methods including random forest and support vector machines. Overall, the Instant Clue aided multilayered proteomic analysis revealed FBXO30 as a novel member of the insulin signalling

FBXO30^{ΔF-box} is not able to assemble the SCF complex and FBXO30^{8CA} misses 8 cysteine residues needed for proper substrate recognition (TRAF Zinc Finger).

pathway that is regulated by its insulin - dependent phosphorylation at S383 and might be involved in vesicle transport / GLUT4 translocation by ubiquitylation of potential substrates.

ZUSAMMENFASSUNG

Innerhalb der vorliegenden Arbeit wurde ein Diabetes-Maus Modell (db/db Maus) verwendet, um Veränderung des Phosphorylierungs- musters in der Leber mittels eines Massenspektrometrie-SILAC basierten Ansatzes (LC-MS/MS) zu detektieren. Dabei konnte eine starke Reduktion einer Phosphorylierung an der Aminosäureposition Serin 383 des Proteins F-box only proteins 30 (FBXO30) in Konditionen der Insulinresistenz (db/db Maus) detektiert werden. Daraufhin wurde die Abhängigkeit dieser Phosphorylierung von Insulin in der Maus untersucht. Dazu wurden Kontroll- und db/db Mäuse mit Insulin oder Saline als Kontrolle injiziert. Es konnte gezeigt werden, dass die FBXO30 Phosphorylierung in der Leber von Mäusen von Insulin abhängig ist. Weiterhin wurden in BAT Zellen durch ein SILAC basiertes Insulinsignalwege Proteomikscreening, unter der Verwendung von verschiedenen Inhibitoren für Schlüsselkinasen, ERK1/2 als die verantwortliche Kinase für die Phosphorylierung von FBXO30 identifiziert. Die direkte Phosphorylierung von FBXO30 durch ERK1 wurde in einem in-vitro Kinaseassay gezeigt. In einer weiteren Studie wurden Mäuse über Nacht gefastet und anschließend war es den Mäusen für 30 min erlaubt, Futter aufzunehmen. In den Lebern konnte eine stark erhöhte Phosphorylierung von FBXO30 an Serin 383 detektiert werden. Des Weiteren wurde eine Transkriptomanalyse mittels NGS Sequenzierung nach 30, 60, 120 und 240 min der Nahrungsaufnahme durchgeführt. Dabei wurde eine transkriptionelle Hochregulation von *Fbxo30* nach 30 min und 60 min festgestellt. Im Gegensatz dazu, wurde das Proteinlevel nach 30 min stark reduziert detektiert, was mit der Aktivierung von ERK1/2 korrelierte. Dies deutete darauf hin, dass die Phosphorylierung von FBXO30 die Ubiquitinligase aktiviert und diese sich daraufhin selbst ubiquitiniert, das wiederum zum proteasomalen Abbau führt. Um diese Reduktion durch Aktivierung der Ubiquitinligaseaktivität von FBXO30 wiederherzustellen wird die Genexpression (mRNA) erhöht.

Um potentielle Substrate der E3 Ligase FBXO30 zu identifizieren wurden mittels der CRISPR/Cas9 Technik *Fbxo30*^{-/-} BAT Zellen erstellt und verschiedene *Fbxo30* Konstrukte (*Fbxo30*^{WT}, *Fbxo30*^{S383D}, *Fbxo30*^{8CA}, *Fbxo30*^{ΔF-box}) transient überexprimiert. Anschließend wurde ein GlyGly Screen durchgeführt, bei dem Ubiquitinierungen von Proteinen mittels Massenspektrometrie identifiziert und quantifiziert werden können. Hierbei wurden mehr als 45.000 GlyGly Modifizierungen an Lysinresten identifiziert und mögliche Substrate konnten durch strenge Filterkriterien herauskristallisiert werden.

Darunter fielen mehrere Proteine des Mikrotubuli-Aktinin Systems, wie zum Beispiel ACTN1/4, PIK3C2A und VCL. Für die Mehrzahl der Substrate konnte durch vorangegangene Studien gezeigt werden, dass diese einen Einfluss auf die GLUT4 Translokation haben und demnach den insulinabhängigen Einstrom von Glukose in die Zelle beeinflussen. Einige Substrate konnten durch komplementierende Methoden bestätigt werden. Um die physiologische Rolle von *Fbxo30* zu verstehen, wurde die knock-out Maus generiert. *Fbxo30*^{-/-} und Wildtyp Mäuse wurden für 8 Wochen mit einer fettreichen Diät (HFD) gefüttert. Mittels eines Glukosetoleranztestes sowie durch einen Insulintoleranztest konnte eine signifikant reduzierte Glukosetoleranz sowie Insulinsensitivität bei nicht veränderten Körpergewichten in

Fbxo30^{8CA} ist nicht
fähig Substrate zu
erkennen und
Fbxo30^{ΔF-box} kann
aufgrund der
fehlende F-box
Domäne keinen SCF
Komplex bilden.

der Maus festgestellt werden.

Für die Analyse der vielzähligen Proteomikstudien wurde eine Software namens Instant Clue entwickelt (www.instantclue.uni-koeln.de), die eine intuitive visuelle und statistische Analyse von hochdimensionalen Datensätzen erlaubt. Die statistischen Methoden umfassen zum Beispiel die Hauptkomponentenanalyse sowie Methoden zur Analyse von *multiomik* Ansätzen.

Zusammenfassend wurde durch die Instant Clue unterstützte mehrschichtige Proteomanalyse eine E3 Ligase FBXO30 mit einer insulinabhängigen Phosphorylierung identifiziert. Es wurde weiter gezeigt, dass auch die Abundanz sowie die transkriptionale Regulation in-vivo von Insulin beziehungsweise des MAPK Signalweges abhängt. Des Weiteren wurde eine mögliche physiologische Rolle in der Entwicklung einer Insulinresistenz aufgedeckt.